

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-191034

(43)Date of publication of application : 28.07.1995

(51)Int.Cl.

G01N 33/547

G01N 33/543

(21)Application number : 05-352763

(71)Applicant : UNITIKA LTD

(22)Date of filing : 27.12.1993

(72)Inventor : YABUSHITA YASUKI

KOIKE NORIO

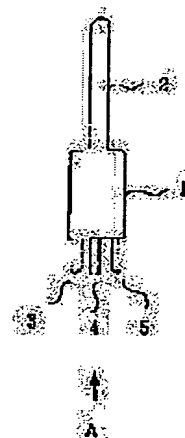
OKADA KEIJI

HANADA MASAKO

**(54) PATHOGENIC FACTOR DETECTING MATERIAL AND PATHOGENIC FACTOR DETECTING METHOD USING IT****(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To simultaneously detect pathogenic factors by preparing molded high polymer bodies on each of which an antibody is immobilized by a covalent bond through an acid anhydride group against one kind of pathogenic factor and detecting pathogenic factors contained in a specimen through an antigen- antibody reaction by using a pathogenic factor detecting material obtained by combining the molded high polymer bodies.

**CONSTITUTION:** Molded high polymer bodies 3, 4, and 5 on which antibodies are immobilized are combined with a substrate 1 so that a plurality of pathogenic factors can be simultaneously discriminated and detected. A pathogenic factor detecting material is formed by bonding or inserting the bodies 3, 4, and 5 to or into the end section of the substrate 1 at a plurality of locations. When an antibody containing a marker enzyme is used after the bodies 3, 4, and 5 are made to react to the specimen by holding the detecting material by its stick section 2, a plurality of kinds of pathogenic factors can be discriminated and detected.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 18.12.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 04.03.2003

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-191034

(43) 公開日 平成7年(1995)7月28日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/547				
33/543	5 2 5 E			

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平5-352763

(22) 出願日 平成5年(1993)12月27日

(71) 出願人 000004503

ユニチカ株式会社  
兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地

(72) 発明者 藪下 安紀

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

(72) 発明者 小池 紀夫

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

(72) 発明者 岡田 圭史

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病原因子検出材料及びこれを用いた病原因子検出方法

(57) 【要約】

【構成】 1種類の病原因子に対する抗体を酸無水物基を介して共有結合により固定化した高分子成形体を基材上に複数設けたことを特徴とする病原因子検出材料及びこれを用いた病原因子検出方法。

【効果】 特別な分析装置を必要とせず、検体中の複数の病原因子を極めて迅速・簡便に鑑別検出することが可能である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 1種類の病原因子に対する抗体を酸無水物基を介して共有結合により固定化した高分子成形体を基材上に複数設けたことを特徴とする病原因子検出材料。

【請求項2】 1種類の病原因子に対する抗体を酸無水物基を介して共有結合により固定化した高分子成形体を基材上に複数設けた病原因子検出材料を用いて病原因子を抗原抗体反応により検出するに際し、上記高分子成形体に固定化された抗体に病原因子を捕捉した後、上記病原因子に標識酵素を有する抗体を結合させ、その標識酵素を基質と反応させて、不溶性生成物を生成させることを特徴とする病原因子検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、臨床検査、食品検査等の分野で利用される病原因子検出材料及びそれを用いた病原因子検出方法に関し、詳しくは高分子成形体表面で複数の病原因子を、特別な分析装置を必要とせず、極めて迅速に直接肉眼により鑑別・検出できる病原因子検出材料及びそれを用いた病原因子検出方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】病気の正しい診断、治療に際してはその原因となる病原因子の検査が正確にかつ、迅速に行われる必要がある。病原因子が微生物である場合、一般的に行われている培養検査法では検査に熟練を要する上、10～16時間の増菌培養、18～24時間の分離培養が必要で検査成績が判明するためには長時間を要し、臨床医の治療に際する要求に必ずしも応えられていないのが現状で、病原因子の検査においては臨床で適確に役立つ検査法の開発が望まれている。

【0003】これらの問題を解決する手段として最近、DNAプローブ法や免疫学的方法が開発され研究が進められているが、このうち免疫学的方法は抗原抗体反応を利用するため特異性、迅速性、簡便性などの点で優れ、しかも直接検体を検索でき、極めて迅速に診断が可能となり得るものとして期待される。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】近年、これら免疫学的手法を用いた病原因子の検出方法は盛んに研究されてきており、その一つにラテックス粒子に毒素に対する抗体を非特異的に吸着させ抗原抗体反応に伴うラテックスの凝集反応を調べる方法（ラテックス凝集法）があるが、感度が比較的低く検査時間がかかり、判定が難しく安定した結果が得られにくい等、取り扱いに関する問題点も有していた。

【0005】また、現在多く用いられてきている方法に、病原因子に対する抗体をタンパク質と高分子成形体との間の疎水的相互作用により物理的に吸着させる方法

があり、その代表的なものとしてポリスチレンからなるマイクロプレートやポリスチレン、ナイロン、アガロース、ガラスなどのビーズを用いて、これと検体を反応させた後酵素標識抗体を加え、プレートやビーズに回収された酵素活性を測定する方法（サンドイッチ ELISA法）がある。この時、反応液中の基質が分解して生ずる生成物が近紫外(190～400nm)または可視(400～800nm)領域における吸収をもつかあるいは蛍光物質を生ずるとき分光機器を用いて検出測定を行っている。

【0006】しかし、上記2つの免疫学的方法は、一つの抗原を一つの反応液から検出する反応系をとっており、複数の抗原を一つの反応液より同時に検出することは不可能であった。また、この検出系で複数の抗原を同時に検出するためには検出したい抗原の数だけ検体が必要となり、検出反応の系列数、検出時間、検体数等が共に増加するために、簡便性、迅速性、コストの点で大きな問題点があった。

【0007】このように複数の抗原を同時に、簡便かつ迅速に鑑別・検出するためには、一つの材料にそれぞれの抗原に対する抗体を固定化した固層を複数組合わせ、さらに抗体を固定化した固層自体に発色などの可視的变化を起こさせる方法が考えられる。また、一つの材料に、抗原に対する抗体を固定化した固層を複数組合わせるためには、それぞれの抗体を固定化した固層を短時間でも乾燥条件下に置く必要がある。

【0008】現在、広く一般に用いられている抗体と固層の固定化方法としては物理的吸着による方法があるが、この方法で得られた抗体固定化高分子成形体を用いて抗原を検出する場合、抗体であるタンパク質と高分子成形体とが非特異的な疎水的相互作用により結合しているため、結合が不安定で、乾燥条件下に置くと固層に結合させた抗体が容易に脱離し、その結果感度が低くなったり、再現性が悪い等の問題が生じた。このため抗体を物理的吸着させた固層は乾燥条件下に置くことは不可能であり、Okuraの報告（Microbiol. Immunol. 32, 807-816(1988)）では、抗体を物理的吸着により固定化したポリスチレンビーズを溶液中に保存している。

【0009】一方、化学的に高分子成形体と抗体を固定化させる方法を用いた場合、得られた抗体固定化高分子成形体は、上記物理的吸着により固定化した場合と比較して、抗体と高分子成形体が安定に結合しているにもかかわらず、溶液中に保存しなければならず、その保存期間も4週間程度と非常に短いものであった。また、化学的に固定化した抗体固定化高分子成形体を用いて検出を行った場合、抗体結合料に比べて検出感度が低いという問題があった。このため、化学的固定化方法は、効率的に抗体を固定化する方法、安定な状態で保存可能な抗体固定化高分子成形体を得るための方法として必ずしも適した方法ではなかった。

【0010】また、現在知られている化学的固定化方法

の代表的なものには、ヒドラジド基を導入したポリスチレンをグルタルアルデヒド処理したものに抗体を固定化する方法(石井 勝:臨床検査、vol.34、759 (1990))、アルキルアミノ基を導入したポリスチレンをグルタルアルデヒド処理したものに抗体を固定化する方法

(石川栄治監訳「エンザイムイムノアッセイ」東京化学同人、1989年)、サンガー試薬を導入したポリスチレンをグルタルアルデヒド処理したものに抗体を固定化する方法(Sanger: Biochem. J., 39, 507 (1945))、部分加水分解したナイロンをグルタルアルデヒドまたはカルボジイミド処理したものに抗体を固定化する方法(He 10 ndry, Herrmann: J. Immunol. Methods, 35, 285 (1980))、アルキルアミノ基を導入したポリスチレンに無水コハク酸を作用させ、得られたカルボキシル基と抗体のもつアミノ基とをカルボジイミドを用いて結合させる方法(石井 勝:臨床検査、vol.34、759 (1990))等がある。しかし、これらの方法は高分子成形体表面上の1つの反応基に対して1分子の抗体を結合させるものであり、また比較的厳しい反応条件下で抗体の固定化反応を行うので、固定化に際して多量の抗体が必要である等の問題点がある。

【0011】本発明は特別な分析装置を必要とせず、検体中の複数の病原因子を極めて迅速・簡便に、しかも安定に鑑別・検出することが可能な病原因子検出材料及びそれを用いた病原因子検出方法を提供することを目的とする。

#### 【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記のごとき問題点を解決するために鋭意検討した結果、1種類の病原因子に対する抗体を酸無水物基を介して共有結合により固定した高分子成形体を病原因子ごとに作製し、これらを複数組合わせて得られる病原因子検出材料を用いて、検体中の病原因子を抗原抗体反応により検出することにより、直接肉眼で複数の病原因子を同時に検出することができることを見出し、本発明に到達した。

【0013】すなわち、本発明は1種類の病原因子に対する抗体を酸無水物基を介して共有結合により固定化した高分子成形体を基体上に複数設けたことを特徴とする病原因子検出材料、及び1種類の病原因子に対する抗体を酸無水物基を介して共有結合により固定化した高分子成形体を基体上に複数設けた病原因子検出材料を用いて病原因子を抗原抗体反応により検出するに際し、上記高分子成形体に固定化された抗体に病原因子を捕捉した後、上記病原因子に標識酵素を有する抗体を結合させ、その標識酵素を基質と反応させて、不溶性生成物を生成させることを特徴とする病原因子検出方法を要旨とするものである。

【0014】以下、本発明を詳細に説明する。本発明における病原因子とは病気の原因物質であり、例えば結核菌、ブドウ球菌、レンサ球菌、淋菌、梅毒菌、百日咳

菌、破傷風菌、大腸菌、肺炎球菌、緑膿菌、赤痢菌、ジフテリア菌、腸チフス菌、パラチフス菌、セレウス菌、エルシニア菌、カンピロバクター、ウエルシュ菌、ディフィシル菌、サルモネラ菌、腸炎ビブリオ、コレラ菌等の細菌、真菌、肺炎ウィルス、エイズウィルス、ロタウィルス、クラミジアウィルス、ヘルペスウィルス、RSウィルス、インフルエンザウィルス、麻疹ウィルス、日本脳炎ウィルス等のウィルスなどの病原微生物、およびボツリヌス菌の産生するボツリヌス毒素、ブドウ球菌のエンテロトキシン、TSS毒素、腸炎ビブリオの溶血毒、コレラ菌のコレラエンテロトキシン、赤痢菌の志賀毒素、毒素原性大腸菌のエンテロトキシン、ジフテリア菌のジフテリア毒素、破傷風菌の破傷風毒素、百日咳菌の百日咳毒素、ディフィシル菌のトキシンA、緑膿菌のエクソトキシンA、ウエルシュ菌のホスホリパーゼC( $\alpha$ -毒素)やエンテロトキシンなどの微生物が産生する毒素や定着因子等が挙げられる。

【0015】本発明における病原因子検出材料は抗体を固定化した高分子成形体と、これらを複数設けた基材とからなる。抗体を固定化する高分子成形体の形状としてはフィルム、シート、チューブ、繊維、スティック等の形状が挙げられる。また、材質としては例えばエチレン-酢酸ビニル共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリウレタン、ポリエチレン、ポリスチレン、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネートなどの合成高分子、デンプン、グルテン、キチン、セルロース、天然ゴム等の天然高分子及びそれらの誘導体が挙げられる。また、疎水基を持ったアガロース誘導体、ニトロセルロースや、それらの誘導体等も挙げられる。

【0016】基材の形状としては、スティック状、スリップ状、チューブ状等が挙げられる。基材の材質としては有機高分子材料、無機高分子材料を問わないが、例えば有機高分子材料としては、ポリエチレン、ポリプロピレン等の材料表面に反応性官能基を持たない材料が好ましい。

【0017】抗体を固定化した高分子成形体(以下、抗体固定化高分子成形体)と基材との組合わせ方は、複数の病原因子を同時に鑑別・検出することができる組合せであればいかなるものでもよい。高分子成形体と基材との組合せ方の例を図面を用いて説明する。

【0018】図1は円筒状チップを基材とし、複数のシート状の抗体固定化高分子成形体を有する病原因子検出材料の例である。基材1の端部の複数箇所に抗体固定化高分子成形体3、4、5をそれぞれ接着又は挟み込むことにより病原因子検出材料が形成されている。この病原因子検出材料は、軸部2をつまみ、抗体固定化高分子成形体3、4、5を検体と反応させた後、標識酵素を有する抗体を用いることにより、複数の病原因子を鑑別・検出することができる。

【0019】図3は円筒状チップを基材とし、複数の口

ッド状の抗体固定化高分子成形体を有する病原因子検出材料の例である。基材1の端部の複数箇所に抗体固定化高分子成形体6、7、8をそれぞれ接着又は挟み込むことにより病原因子検出材料が形成されている。この病原因子検出材料は、軸部2をつまみ、抗体固定化高分子成形体6、7、8を検体と反応させた後、酵素標識抗体を用いることにより、複数の病原因子を鑑別・検出することができる。

【0020】図5はスリップ状の基材に、複数のシート状の抗体固定化高分子成形体を有する病原因子検出材料の例である。基材9の複数箇所に抗体固定化高分子成形体6、7、8をそれぞれ平面的に接着又は挟み込むことにより病原因子検出材料が形成されている。この病原因子検出材料は、基材9の端部をつまみ、抗体固定化高分子成形体10、11、12を検体と反応させた後、酵素標識抗体を用いることにより、複数の病原因子を鑑別検出することができる。

【0021】その他の例として、ロッド状の抗体固定化高分子成形体を数本縦に積み重ねることにより得られる1本のスティック状の病原因子検出材料、1本の円筒状の基材に繊維状の抗体固定化材料をホウキ状に束ねることにより得られる病原因子検出材料等が挙げられる。

【0022】本発明では高分子成形体表面に抗体が酸無水物基を介して共有結合により固定化されているが、これは酸無水物基と抗体の有するアミノ基、チオール基等の間で共有結合が起きるためである。酸無水物基を介して抗体を高分子成形体に固定化する方法としては、高分子成形体表面に存在する酸無水物基と抗体を結合させてもよいし、高分子成形体表面に存在する他の反応性官能基に酸無水物基を導入し、この酸無水物基を介して化学的に抗体を固定化することもできる。また、酸無水物基、反応性官能基のいずれも高分子成形体表面にない場合には、成形体表面に直接酸無水物基を導入して抗体を固定化してもよいし、あるいは反応性官能基を導入した後、無水物基を導入して抗体を固定化してもよい。

【0023】高分子成形体表面に存在する酸無水物基以外の反応性官能基としてはカルボキシル基、ホルミル基、アミノ基、アジド基、イソシアネート基、クロロホルミル基、エポキシ基等が挙げられる。

【0024】高分子成形体表面に反応性官能基を導入する方法としては、例えばエチレン-酢酸ビニル共重合体にカルボキシル基を導入する場合は、エチレン-酢酸ビニル共重合体をケン化した後、カルボキシメチル化することにより導入される。また、カルボキシル基はヒドラジル基を経てアジド基に誘導することができるエチレン-酢酸ビニル共重合体にアミノ基を導入するには、例えばケン化したエチレン-酢酸ビニル共重合体をアミノアセタール化すればよい。ナイロンに大量のアミノ基を導入するには、例えばナイロンを酸処理し表面を加水分解して、カルボキシル基を露出させた後、ポリエチレンイ

ミンなどのポリアミンを作用させればよい。

【0025】また、反応性官能基が存在しない高分子化合物はアンモニア-プラズマ処理や $\gamma$ 線、電子線などの放射線処理によりアミノ基等の目的とする反応性官能基を導入することが可能である。ポリウレタンなどのポリアミンについては予めアミノ基が存在するので、そのまま酸無水物基を有する高分子化合物と反応させることができる。

【0026】高分子成形体表面に導入する酸無水物基を有する高分子化合物としてはスチレン-無水マレイン酸共重合体、エチレン-無水マレイン酸共重合体、メチルビニルエーテル-無水マレイン酸共重合体等が挙げられる。また、例えばポリウレタンに無水マレイン酸を $\gamma$ 線や電子線によりグラフト重合させ酸無水物基を直接導入することもできる。

【0027】抗体の固定化処理を行う際、例えば抗体溶液を用いて処理できるが、この時使用する抗体溶液としては、抗体を好ましくは水あるいは生理食塩水に、好ましくは10~1000倍の濃度に希釈した溶液を用いることができる。抗体溶液中には必要に応じて抗菌剤、安定化剤等を含んでも良く、また抗体溶液で処理を行うに際しての温度、時間の条件は、好ましくは常温以下の温度で、好ましくは1時間以上である。

【0028】本発明における感染症の病原因子に対する抗体は、例えばモノクローナル抗体の場合は、精製した病原因子すなわち毒素や菌体等を免疫したマウスの脾細胞とミエロマ細胞との融合細胞のクローンをを用いてマウス腹水を誘導したものをを用いる。またポリクローナル抗体は毒素や菌体等の抗原を用いてウサギ、ヤギ、ラット、ヒツジ、ニワトリ、ブタ、ロバ、モルモット、イヌ、ウシなどを免疫して得られる血清より精製したものをを用いる。

【0029】本発明は病原因子に対する抗体を固定化した高分子成形体を用いて抗原すなわち病原因子を直接捕捉するが、その検出法として例えばサンドイッチ法を用いる。これは高分子成形体に固定化した抗体とは別種の動物で調製した抗体を、病原因子を捕捉した高分子成形体と反応させ、次いで酵素などを標識した抗体を反応させる方法である。また、病原因子を捕捉した高分子成形体に、直接酵素などを標識した抗体を反応させてもよい。検出に用いられる酵素としてはペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、カルボニックアンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられる。一方、酵素以外に検出に用いられる標識体として金コロイド粒子、銀コロイド粒子等が挙げられる。また、アビジン-ビオチンを用いたり抗体結合性を持つプロテインA、プロテインGやレクチンを介して標識体を導入させる方法等も用いられる。

【0030】本発明に用いる不溶性生成物を生ずる酵素

の基質については、例えば標識酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には4-クロロ-1-ナフトールや3, 3'-ジアミノベンジジン、*p*-フェニレンジアミン塩酸とピロカテコールからなるHanker-Yates (HY) 試薬、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンなどの基質が用いられ、アルカリフォスファターゼを使用する場合にはニトロブルー-テトラゾリウムや $\beta$ -ナフチルリン酸と5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸や*m*-フェナジンメトサルフェートなどを混合した基質などが用いられる。グルコースオキシダーゼを使用する場合にはニトロブルー-テトラゾリウムと*m*-フェナジンメトサルフェートを混合した基質などが用いられる。

【0031】本発明の病原因子検出材料を用いて複数の病原因子を検出するには、抗原である病原因子と反応させる前に、材料表面の非特異的に抗体等と結合する部分を抗血清や非干渉性のタンパク質でブロックする操作（ブロッッキング）を行うことが好ましい。ブロッッキングに使用されるタンパク質はウシ血清アルブミン（BSA）、オボアルブミン、ヘモグロビン、ゼラチン等が挙げられ、これらタンパク質を0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.2）あるいはリン酸緩衝液（pH7.2）に溶解して、37℃、1.5時間または4℃、一晚材料と反応させればよい。反応後は材料を0.05% ポリエチレンソルビタンモノラウレート（Tween 20）、0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液にて2～6回洗浄する。

【0032】本発明に用いる検体としては下痢便、痰、体液等のヒト患者材料を直接用いるか、患者材料より分離した菌体の培養上清を用いればよい。患者材料を検体とする場合は、検体を直接用いるか、検体を0.1～10% BSA（ウシ血清アルブミン）、0.05% Tween 20、0.9% 塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液で2～50倍に希釈して用いることが好ましい。一方、患者材料より分離した菌体の培養上清を用いる場合、例として腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* を挙げると、患者材料より分離された菌株をペプトン-食塩培地（1% ポリペプトン（Difco社製）、3% 塩化ナトリウム、0.5%リン酸水素二ナトリウム）あるいはSPP培地（1% ポリペプトン（Difco社製）、0.5%塩化ナトリウム、0.2%グルコース、0.5%リン酸水素二ナトリウム）を用いて3時間～一晚培養した後、得られた遠心分離（5,000rpm 15分間）上清を検体とする。また、コレラ菌 *Vibrio cholerae* の場合、患者材料より分離された菌株を2% Casamino acid（Difco社製）、0.6% yeast extract（Difco社製）、0.25%塩化ナトリウム、0.871%リン酸水素二ナトリウム、0.25%グルコース、5%塩化マグネシウム、0.5%塩化マンガニン、0.5%塩化第三鉄、0.001%硫酸を用いて3時間～一晚培養した後、得られた遠心分離（5,000rpm 15分間）上清を検体とする。

【0033】検体を作用させた病原因子検出材料は、次にそれぞれの病原因子に対するポリクローナル抗体を500～2000倍希釈、混合した0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液に作用させる。この時の反応条件は室温～37℃で10～90分間が好ましい。また、それぞれの病原因子に対する抗体に直接標識酵素を結合させたものを用いてもよい。反応後は材料を0.05% ポリエチレンソルビタンモノラウレート、0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液にて2～6回洗浄する。

【0034】次いで高分子成形体を、病原因子に対するポリクローナル抗体を得た同じ動物種のイムノグロブリンに対する抗体と標識酵素が結合した酵素標識抗体を500～2000倍希釈した0.05% ポリエチレンソルビタンモノラウレート、0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液に反応させる。この時の反応条件は室温～37℃で10～90分間が好ましい。反応後は材料を0.05% ポリエチレンソルビタンモノラウレート、0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液にて2～6回洗浄する。

【0035】上記の様に反応させて得られた高分子成形体は、酵素反応後に不溶性生成物を生ずる酵素基質溶液に反応させるが、水溶液に対する溶解度の低い基質を用いる場合はジメチルスルホキシド（DMSO）、ジメチルホルムアミド（DMF）、メタノール、エタノールなどの有機溶媒に予め溶解した後に水溶液に混合したものを用いる。

【0036】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例1

腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒（TDH）、コレラ菌のコレラ毒素（CT）、毒素原性大腸菌の易熱性エンテロトキシン（LT）に対する抗体をそれぞれ固定化した3枚のナイロンスリップを組合わせた病原因子検出材料を用いて腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒（TDH）を鑑別検出した結果を以下に示した。

【0037】腸炎ビブリオの精製TDHは、次の方法で得た。すなわち *Vibrio parahaemolyticus* T-4750（大阪大学微生物病研究所 保有菌）をペプトン食塩培地（1%ペプトン（Difco社製）、3%塩化ナトリウム）で37℃、20時間振盪培養し10,000rpm、20分間の遠心分離により培養上清を得た。上清に56g/100mlの硫酸アンモニウムを加え生じた沈殿を10mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.2）に溶解した。同緩衝液で透析した後、2gの臭化シアン活性化 Sepharose 4B（Pharmacia社製）に10mgの精製した抗TDHイムノグロブリンを結合させることにより得られるイムノアフィニティカラムにかけ0.5M塩化ナトリウムを含む0.2Mグリシン-塩酸緩衝液（pH2.7）で溶出させることによりTDHの精製を行

った。コレラ菌の精製CT、毒素原性大腸菌の精製LTはSIGMA社より購入したものを用いた。

【0038】TDH、CT、LTに対するそれぞれのポリクローナル抗体は以下の方法により得た。すなわち、精製毒素を25 $\mu$ g/mlになる様に0.9%塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0:以下PBSと略す)に溶解し、これに等量の Freund completeアジュバント

(Difco 社製)を加えたものを用いて体重約2kgのウサギに免疫し、25日後再び先に調製した精製毒素溶液と等量の Freund incompleteアジュバント (Difco 社製)を加えたものを免疫させ、抗血清を得た。これに50%の硫酸アンモニウムを加え沈殿を生じさせるが、これを2回繰返し得られた沈殿を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解し、同緩衝液で透析した後、得られた免疫グロブリンをそれぞれの毒素のポリクローナル抗体として用いた。

【0039】TDH、CT、LTに対するそれぞれのモノクローナル抗体は以下の方法により得た。すなわち、PBSにて25 $\mu$ g/mlに溶解した精製毒素0.5mlを等量の Freund complete アジュバントと共に用いて6~8週齢 BALB/c マウスに免疫し、21日後更に、先に調製した精製毒素溶液に等量の Freund incomplete アジュバントを加えたものを免疫し、32日目にマウスの脾細胞を得た。得られた脾細胞はSP2 /o ミエロマ細胞とそれぞれ約1 $\times 10^6$ 個ずつポリエチレングリコール(PEG1500, Boehringer Mannheim 社製)にて融合させ、2.5%ウシ血清、1 $\times 10^6$ Mヒポキサンチン、4 $\times 10^{-7}$ Mアミノプテリン、1.6 $\times 10^{-4}$ Mチミジンを含むCelgrosser-H培地(住友製薬社製)でハイブリドーマを選択した。得られたハイブリドーマはBALB/c マウス腹腔に2 $\times 10^6$ 個注入し7~14日で腹水が著明になった時点で腹水を回収し、2,500rpm、10分間遠心分離して得た上清をそれぞれの毒素のモノクローナル抗体として用いた。

【0040】ナイロン6(ユニチカ社製)からなる縦10mm、横3mm、厚さ0.2mmのシートを3N塩酸中に30 $^{\circ}$ C、30分間浸漬した後、蒸留水にて洗浄した。乾燥後10%(w/v)のポリエチレンイミン水溶液とメタノールとの1:5混合液に室温で30分間浸漬した後、2倍量の5%ジシクロヘキシルカルボジイミドのメタノール溶液を加え、引き続き室温で2時間浸漬した。メタノールにて洗浄、乾燥後、2%(w/v)無水マレイン酸-メチルピニルエーテル共重合体の脱水アセトン溶液中に室温で1時間浸漬し、アセトンにて洗浄後真空乾燥したシートを抗体の固定化に用いた。固定化はこのスリップをTDH、CT、LTに対するマウス腹水より得られたそれぞれのモノクローナル抗体を50倍希釈した10mM酢酸緩衝液(pH4.0)に浸漬することにより行った。

【0041】TDH、CT、LTに対するモノクローナル抗体をそれぞれ固定化した3枚のナイロンシートはプラスチック用接着剤(住友スリーエム社製)を用いて8mm径の円筒上のポリプロピレン製チップの下端部に60

間隔でくし状に接着し、これをTDH、CT、LT検出材料とした。

【0042】このようにして得た病原因子検出材料のうち抗体固定化高分子成形体の部分を1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む0.9%塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.2, 以下PBSと略す)に浸漬することによりブロッキングを行った後、500ng/ml精製TDHを含むPBSに15分間浸漬した。抗体固定化材料部分に捕捉された毒素の検出に際しては、0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレートを含むPBSにて洗浄後、PBSにて500倍希釈したTDH、CT、LTに対するウサギポリクローナル抗体の混合液を常温で15分間反応させ、再び洗浄後アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG(Cappel社製)を500倍希釈した0.05% Tween 20を含むPBSにて常温で15分間反応させ、洗浄後0.25mMニトロブルーテトラゾリウム、0.25mM5-ブローモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)に37 $^{\circ}$ C、10分間浸漬することにより行った。

【0043】このように反応させた病原因子検出材料はTDHに対する抗体を固定化したナイロンシートの部分のみに濃青色の発色が認められ、CT、LTに対する抗体を固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。また、毒素の含まれていないPBSを検体とした以外は先の操作と全く同じ操作を行った結果、病原因子検出材料の抗体固定化シート部分のいずれにも発色は認められなかった。

【0044】実施例2

ナイロン6(ユニチカ社製)からなる縦5mm、横3mm、厚さ0.2mmのシートに実施例1と全く同じ方法にてTDH、CT、LTに対するモノクローナル抗体をそれぞれ固定化し、得られた3枚のナイロンシートを縦50mm、横8mm、厚さ1mmのポリプロピレン製シートの下端部より3mm間隔にて並列に接着し、これをTDH、CT、LT検出材料とした。

【0045】この病原因子検出材料を用いて実施例1と同様の操作を行い、100ng/mlの精製TDHを鑑別検出した。

【0046】このように反応させた病原因子検出材料はTDHに対する抗体を固定化したナイロンシートの部分のみに濃青色の発色が認められ、CT、LTに対する抗体を固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。また、毒素の含まれていないPBSを検体とした以外は先の操作と全く同じ操作を行った結果、病原因子検出材料の抗体固定化シート部分のいずれにも発色は認められなかった。

【0047】実施例3

ナイロン6(ユニチカ社製)からなる1.5mm径、長さ10mmのロッドに実施例1と全く同じ方法にてTDH、CT、LTに対するモノクローナル抗体をそれぞれ固定化



し、得られた3本のナイロンロッドを8mm径の円筒上のポリプロピレン製チップの下端部に60間隔でくし状に接着し、これをTDH、CT、LT検出材料とした。

【0048】この病原因子検出材料を用いて実施例1と同様の操作を行い、100ng/mlの精製TDHを鑑別検出した。

【0049】このように反応させた病原因子検出材料はTDHに対する抗体を固定化したナイロンロッドの部分のみに濃青色の発色が認められ、CT、LTに対する抗体を固定化したナイロンロッド部分には発色は認められなかった。また、毒素の含まれていないPBSを検体とした以外は先の操作と全く同じ操作を行った結果、病原因子検出材料の抗体固定化ナイロンロッド部分のいづれにも発色は認められなかった。

#### 【0050】実施例4

実施例1と全く同じ方法で得られたTDH、CT、LTに対するモノクローナル抗体をそれぞれ固定化した3枚のナイロンシートと円筒上のポリプロピレン製チップで構成された病原因子検出材料を用いて実施例1と同様の操作を行い、100ng/mlの精製TDHと100ng/mlの精製CTの混合液より両毒素を鑑別検出した。

【0051】このように反応させた病原因子検出材料のTDHに対する抗体を固定化したナイロンシート部分とCTに対する抗体を固定化したナイロンシート部分のみに濃青色の発色が認められ、LTに対する抗体を固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。また、毒素の含まれていないPBSを検体とした以外は先の操作と全く同じ操作を行った病原因子検出材料の抗体固定化シート部分のいづれにも発色は認められなかった。

#### 【0052】実施例5

実施例1と全く同じ方法で得られたTDH、CT、LTに対するモノクローナル抗体をそれぞれ固定化した3枚のナイロンシートと円筒上のポリプロピレン製チップで構成された病原因子検出材料を用いて実施例1と同様の操作を行い、100ng/mlの精製CTと100ng/mlの精製LTの混合液より両毒素を鑑別検出した。

\*

\*【0053】このように反応させた病原因子検出材料はCTに対する抗体を固定化したナイロンシート部分とLTに対する抗体を固定化したナイロンシート部分のみに濃青色の発色が認められ、TDHに対する抗体を固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。また、毒素の含まれていないPBSを検体とした以外は先の操作と全く同じ操作を行った結果、病原因子検出材料の抗体固定化シート部分のいづれにも発色は認められなかった。

#### 【0054】

【発明の効果】本発明によれば、特別な分析装置を必要とせず、検体中の複数の病原因子を極めて迅速・簡便に鑑別検出することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の病原因子検出材料の一例を示す正面図である。

【図2】図1をA方向から見た図である。

【図3】本発明の病原因子検出材料の一例を示す正面図である。

【図4】図3をA方向から見た図である。

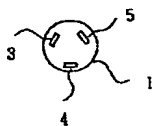
【図5】本発明の病原因子検出材料の一例を示す正面図である。

【図6】図5をA方向から見た図である。

【符号の説明】

- 1 基材
- 2 軸部
- 3 抗体固定化ナイロンシート
- 4 抗体固定化ナイロンシート
- 5 抗体固定化ナイロンシート
- 6 抗体固定化ナイロンロッド
- 7 抗体固定化ナイロンロッド
- 8 抗体固定化ナイロンロッド
- 9 基材
- 10 抗体固定化ナイロンシート
- 11 抗体固定化ナイロンシート
- 12 抗体固定化ナイロンシート

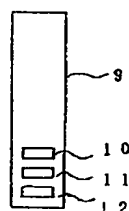
【図2】



【図4】



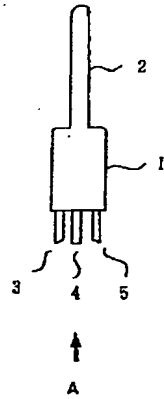
【図5】



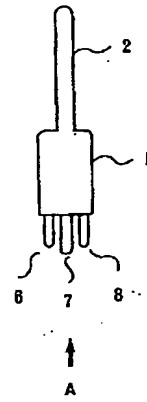
【図6】



【図1】



【図3】



---

フロントページの続き

(72)発明者 花田 正子  
京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株  
式会社中央研究所内

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第6部門第1区分  
 【発行日】平成13年10月5日(2001.10.5)

【公開番号】特開平7-191034  
 【公開日】平成7年7月28日(1995.7.28)  
 【年通号数】公開特許公報7-1911  
 【出願番号】特願平5-352763  
 【国際特許分類第7版】

G01N 33/547  
 33/543 525

【F I】

G01N 33/547  
 33/543 525 E

【手続補正書】

【提出日】平成12年12月18日(2000.12.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正内容】

【0007】このように複数の抗原を同時に、簡便かつ迅速に鑑別・検出するためには、一つの材料にそれぞれの抗原に対する抗体を固定化した固相を複数組合わせ、さらに抗体を固定化した固相自体に発色などの可視的変化を起こさせる方法が考えられる。また、一つの材料に、抗原に対する抗体を固定化した固相を複数組合わせるためには、それぞれの抗体を固定化した固相を短時間でも乾燥条件下に置く必要がある。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】現在、広く一般に用いられている抗体と固相の固定化方法としては物理的吸着による方法があるが、この方法で得られた抗体固定化高分子成形体を用いて抗原を検出する場合、抗体であるタンパク質と高分子成形体とが非特異的な疎水の相互作用により結合しているため、結合が不安定で、乾燥条件下に置くと固相に結合させた抗体が容易に脱離し、その結果感度が低くなったり、再現性が悪い等の問題が生じた。このため抗体を物理的吸着させた固相は乾燥条件下に置くことは不可能であり、Okuraの報告(Microbiol. Immunol. 32, 807-816(1988))では、抗体を物理的吸着により固定化したポリスチレンビーズを溶液中に保存している。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】一方、化学的に高分子成形体と抗体を固定化させる方法を用いた場合、得られた抗体固定化高分子成形体は、上記物理的吸着により固定化した場合と比較して、抗体と高分子成形体が安定に結合しているにもかかわらず、溶液中に保存しなければならず、その保存期間も4週間程度と非常に短いものであった。また、化学的に固定化した抗体固定化高分子成形体を用いて検出を行った場合、抗体結合量に比べて検出感度が低いという問題があった。このため、化学的固定化方法は、効率的に抗体を固定化する方法、安定な状態で保存可能な抗体固定化高分子成形体を得るための方法として必ずしも適した方法ではなかった。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正内容】

【0020】図5はスリップ状の基材に、複数のシート状の抗体固定化高分子成形体を有する病原因子検出材料の例である。基材9の複数個所に抗体固定化高分子成形体10、11、12をそれぞれ平面的に接着することにより病原因子検出材料が形成されている。この病原因子検出材料は、基材9の端部をつまみ、抗体固定化高分子成形体10、11、12を検体と反応させた後、酵素標識抗体を用いることにより、複数の病原因子を鑑別・検出することができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】高分子成形体表面に反応性官能基を導入する方法としては、例えばエチレン-酢酸ビニル共重合体にカルボキシル基を導入する場合は、エチレン-酢酸ビニル共重合体をケン化した後、カルボキシメチル化することにより導入される。また、カルボキシル基はヒドラシル基を経てアジド基に誘導することができる。エチレン-酢酸ビニル共重合体にアミノ基を導入するには、例えばケン化したエチレン-酢酸ビニル共重合体をアミノアセタール化すればよい。ナイロンに大量のアミノ基を導入するには、例えばナイロンを酸処理し表面を加水分解して、カルボキシル基を露出させた後、ポリエチレンジアミンなどのポリアミンを作用させればよい。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0047

【補正方法】変更

【補正内容】

【0047】実施例3

ナイロン6（ユニチカ社製）からなる1.5mm径、長さ10mのロッドに実施例1と全く同じ方法にてTDH、CT、LTに対するモノクローナル抗体をそれぞれ固定化し、得られた3本のナイロンロッドを8mm径の円筒上のポリプロピレン製チップの下端部に60°間隔でくし状に接着し、これをTDH、CT、LT検出材料とした。